

Mu-3 Agar를 이용한 Vancomycin Heteroresistant *Staphylococcus aureus*의 검출

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실, 세균내성연구소

이경원 · 용동은 · 박광일 · 이건수 · 신정원 · 정운섭

Detection of Vancomycin Heteroresistant *Staphylococcus aureus* Using Mu-3 Agar

Kyungwon Lee, M.D., Dongeun Yong, M.D., Kwang-il Park, M.D.,
Keonsoo Yi, M.D., Jeong Won Shin, M.D., and Yunsop Chong, Ph.D.

Department of Clinical Pathology and Research Institute of Bacterial Resistance,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : The aim of the study was to determine prevalence of potential heterogeneous vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (h-VRSA) among methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated in Korea by using Mu-3 agar and to determine the effect of in vitro vancomycin exposure on the resistance.

Methods : MRSA isolated in 1980-1999 were screened for the presence of VISA or h-VRSA using Mu-3 agar. MIC of vancomycin was tested by NCCLS agar dilution and broth microdilution tests. Suspected h-VRSA were selected by vancomycin-containing media and change of resistance was determined by population analysis. A strain with Mu50 type growth was serially exposed to 8 µg/ml of vancomycin containing media and change of the vancomycin resistance was determined.

Results : Among the 455 MRSA isolates, 18 (3.9%) grew on selective brain heart infusion agar (BHIA), and 354 (77.8%) on Mu-3 agar, 66 (14.5%) with Mu3

type growth and 78 (17.1%) with Mu50 type growth. MIC of vancomycin was 11 µg/ml for some of the isolates when inocula were approximately 10⁶ CFU, but VISA was not present when tested by NCCLS broth microdilution test. Exposure of the isolates to vancomycin raised the MIC. Serial exposure once to 8 µg/ml of vancomycin resulted in significant decrease of cells susceptible to 8-12 µg/ml of vancomycin.

Conclusion : VISA was not present among the test isolates, but 34.2% were suspected to be potential h-VRSAs, suggesting possible emergence of VISA if vancomycin was administered prolonged period. It is considered that suitable screening media are vancomycin containing BHIA for VISA and Mu-3 agar for h-VRSA. The isolates showing Mu50 type growth on Mu-3 agar are not always VISA, but rather h-VRSA. (Korean J Infect Dis 32:349~356, 2000)

Key Words : Vancomycin resistance, Heteroresistance, *Staphylococcus aureus*

서 론

Vancomycin은 다른 항균제에 내성인 그람양성 세균의 감염치료에 장기간 유용하게 사용되어 왔다. 그러나 vancomy-

cin에 내성인 *Enterococcus* (vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)가 출현하였고 중요한 원내 감염균이 되었는데, 이 내성의 일부는 plasmid에 의해서 전달된다. 실험적으로는 vancomycin의 MIC가 100 µg/ml인 *Staphylococcus aureus*가 1996년에 보고되었고¹⁾, 이러한 내성균의 출현이 우려되던 중에 일본에서 Hiramatsu 등²⁾은 vancomycin의 MIC가 8 µg/ml로 중간 감수성인 *S. aureus* (vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA; glycopeptide-intermediate *S. aureus*,

접수 : 2000년 7월 30일, 승인 : 2000년 8월 20일
교신저자 : 정운섭. 연세의대 임상병리과, 세균내성연구소
Tel : 02)361-5866, Fax : 02)313-0908
E-mail : whonetkor@yumc.yonsei.ac.kr

GISA)를 보고하였다. VISA 균주는 소수이지만 여러 나라에서 보고되었고³⁻⁵⁾, 우리나라에서도 김 등⁶⁾이 1주를 보고하였다. VISA 분리 보고가 아직 적은 것은 Hiramatsu 등²⁾이 보고하기 전까지는 그 검출이 시도되지 않았고, NCCLS법으로는 검출이 어려웠기 때문일 것이라고 하였다⁷⁾.

VISA의 정확한 검출은 감염 환자의 치료를 위해서 뿐 아니라 이 세균의 전파를 막기 위해서도 필요하다⁸⁾. 그러나 VISA는 일부 세균 세포만이 vancomycin에 내성을 나타내는 heteroresistance형이므로 디스크 확산법뿐 아니라 broth microdilution법으로도 검출하기 어려우며 따라서 Tenover 등⁹⁾은 vancomycin이 6 $\mu\text{g/ml}$ 들은 brain heart infusion agar (BHIA)의 사용을 권장하고 있다. 한편 Hanaki 등¹⁰⁾은 VISA로 변할 수 있는 heterogeneous vancomycin-resistant *S. aureus* (h-VRSA; NCCLS 기준으로는 vancomycin 감수성)를 검출할 수 있는 Mu-3 agar를 개발하였다. 이 배지에서 VISA인 Mu50 균주는 배지전면에 다수 (confluent)의 집락을 형성하며, h-VRSA인 Mu-3 균주는 β -lactam 디스크 주변에만 증식하여 위성현상을 보인다.

우리나라에는 MRSA가 흔하며 또한 1주의 VISA가 보고된 바 있으므로 저자들은 자가제조 BHIA 선별배지로 VISA의 검출을 시도하였으나 검출하지 못하였다. 이에 이 연구에서는 Mu-3 agar를 사용하여 VISA로 변할 수 있는 h-VRSA의 존재를 규명하고자 하였으며 이 배지에 증식된 일부 균주에 대해서 vancomycin의 MIC 시험과 population analysis를 하였고, vancomycin이 들은 배지에 계대 배양한 균주에 대한 vancomycin의 MIC가 높아지는지를 검토하였다.

재료 및 방법

Methicillin 내성 *S. aureus* (MRSA) 균주는 세브란스병원 환자에서 1980-1999년에 분리하여 냉동 보존하였던 494주를 시험에 사용하였다. 대조 균주로는 vancomycin의 MIC가 8 $\mu\text{g/ml}$ 로 VISA인 Mu50 균주, MIC 3 $\mu\text{g/ml}$ 이고 8 $\mu\text{g/ml}$ 의 vancomycin으로 선택할 때 10^{-6} 의 세포에 대한 MIC가 8 $\mu\text{g/ml}$ 로 h-VRSA인 Mu3 균주 및 MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ 로 vancomycin에 감수성 MRSA (vancomycin-susceptible *S. aureus*; VSSA)인 Hi 균주를 일본의 Hiramatsu 교수로부터 분양 받아 사용하였다.

VISA 선별배지는 BHIA (Becton Dickinson, Cockeysville, MD)에 vancomycin (Eli Lilly, Indianapolis, IN)을 6 $\mu\text{g/ml}$ 되게 넣어서⁹⁾ 평판을 만들었다. Mu-3 agar¹⁰⁾는 배지 1 리터

당 vancomycin 4 mg과 Mu3 additive 1 g 등이 들어있는 것 (Becton Dickinson, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

VISA와 h-VRSA 선별을 위해서는 MRSA 균주를 24시간 배양한 후 McFarland 제1관의 탁도로 맞추고 자가 제조 BHIA 선별배지와 Mu-3 agar에 면봉으로 접종하고, Mu-3 agar에는 aztreonam 30 μg 디스크 (Becton Dickinson, Cockeysville, MD)를 놓았다. 접종한 배지를 37°C에 24-48시간 배양한 후에 증식결과를 판독하되 (1) 집락 수를 셀 수 있을 정도인 것, (2) confluent growth (이하 Mu50형 증식으로 칭함)인 것 및 (3) aztreonam 디스크 주변에 위성현상으로 다수의 집락이 생긴 것(이하 Mu3형 증식으로 칭함)을 구별하였다.

Vancomycin의 MIC 시험을 위해서는 BHIA 혹은 BHI (Becton Dickinson, Cockeysville, MD)에 vancomycin의 농도가 1 $\mu\text{g/ml}$ 차이가 되도록 넣고, NCCLS agar dilution 혹은 broth microdilution법으로 시험하였다¹¹⁾. 접종 세균수는 NCCLS의 기준에 따른 MIC 측정을 위해서는 BHIA에는 약 10^4 CFU를, BHI에는 약 10^5 CFU를 접종하였고, 다른 목적의 시험을 위해서는 세균 수를 다르게 하였다. Methicillin의 MIC 시험을 위해서는 2% NaCl을 넣은 Mueller-Hinton agar (Becton Dickinson, Cockeysville, MD)에 약 10^4 CFU를 접종하고 48시간 배양 후에 결과를 판독하였다.

H-VRSA로 추정되는 균주를 vancomycin이 들은 배지에서 배양하면 vancomycin의 MIC가 높아지는지를 시험하기 위해서는 먼저 번 시험에서 가장 높은 농도의 vancomycin이 들은 배지에 증식된 집락을 선택하여 population analysis²⁾를 하였다. Population analysis는 시험세균을 BHI에 접종하여 24시간 배양한 후에 식염수로 10배수 단계 희석하고 각 희석액 50 μl 를 vancomycin이 없는 배지와 vancomycin이 포함된 배지에 접종하고 24-48시간 배양한 후에 가능하면 집락 수가 30-300인 평판에서 집락수를 세고 검체 희석배수를 곱하여 세균수를 계산하였다. 이 세균수 시험은 2개의 평판에 접종 배양하여 집락수의 평균치로 표시하였다.

체액에 도달되는 정도의 vancomycin 농도에 시험세균이 노출될 때 MIC가 어느 정도 신속히 그리고 어느 정도 수준까지 높아지는지 보기 위해서는 Mu50형인 한 균주를 택하여 시험하였다. 즉, vancomycin 농도가 높은 배지에 증식된 집락을 선택하여 5회 연속하여 vancomycin 8 $\mu\text{g/ml}$ 가 들은 BHI에 접종하고 24시간 배양한 후에 10배수 단계 희석하고 population analysis를 하였다.

결 과

1980-1999년에 분리된 455 균주의 MRSA 중 BHIA 선별 배지에는 18주(3.9%) 만이 증식하였고 그 중 2주(0.4%) 만이 11-100개의 집락을 형성하였으나, Mu3 agar에는 354주(77.8%)가 증식하였고 그 중 66주(14.5%)는 h-VRSA로 추정되는 Mu3형 증식을, 78주(17.1%)는 VISA가 의심되는 Mu50형 증식을 보였다(Table 1). MRSA의 분리 연도별로 Mu-3 agar에서의 증식 양상을 보면, Mu3형 증식 균주와 Mu50형 증식 균주는 1980-1985년 분리주보다 1990-1999년 분리주 중에 많았다(Table 2).

Mu-3 agar에 증식된 균주에 대한 methicillin 내성을

NCCLS 한천희석법으로 시험한 바 MIC₅₀과 MIC₉₀는 Mu3형 균주와 Mu50형 균주에 대해서는 각각 1,024 µg/ml와 2048 µg/ml이었으나, 다른 형 균주에 대해서는 각각 512 µg/ml과 1,024 µg/ml이었다(Table 3, Figure 1). 접종 균수를 약 10⁶ CFU로 하여 vancomycin에 대한 감수성을 시험한 바 일부 균주에 대한 MIC는 11 µg/ml이었다(Table 3, Figure 2). 그러나 대조 균주인 Hi, Mu3 및 Mu50에 대한 한천희석법에 의한 MIC의 재현성이 낮았으므로 이들 균주 중 일부를 접종균수 10⁴로 하여 broth microdilution법으로 시험한 바 48시간 배양 후에는 모든 균주에 대한 MIC가 ≤3 µg/ml이었고, 4일 배양 후에도 1주에 대한 MIC 만이 5 µg/ml 이어서 시험된 균주 중에 VISA는 없다고 판단하였다(Table 4).

Mu50형 증식 균주를 대상으로 하여 접종 균수에 따른

Table 1. Comparison of Growth on Laboratory-prepared Screening BHIA and on Mu-3 Agar after 48 h Incubation

Growth (CFU) on Screening BHIA	No. (%) of specimens with growth (CFU) or type on Mu-3 agar*						
	None	1-10	11-100	>100	Mu3-like	Mu50-like	Total
None	97 (21.3)	70 (15.4)	92 (20.2)	40 (8.8)	60 (13.2)	78 (17.1)	437 (96.0)
1-10	4 (0.9)	4 (0.8)	2 (0.4)	0	6 (1.3)	0	16 (3.5)
11-100	0	2 (0.4)	0	0	0	0	2 (0.4)
Total	101 (22.2)	76 (16.7)	94 (20.7)	40 (8.8)	66 (14.5)	78 (17.1)	455 (100)

*Screening BHIA and Mu-3 agar contained vancomycin 6 µg/ml and 4 µg/ml, respectively.

Table 2. Comparison of Growth Patterns on Mu-3 Agar after 48 h Incubation by the Year of Isolation

Year of isolation (No. tested)	No. (%) of specimens with growth (CFU) or type on Mu-3 agar						
	None	1-10	11-100	>100	Mu3-like	Mu50-like	Total
1980-1985	4 (8.3)	5 (10.4)	18 (37.5)	15 (31.3)	0 (0)	6 (12.5)	48 (100)
1990-1998	54 (17.9)	56 (18.5)	58 (19.2)	20 (6.6)	61 (20.2)	53 (17.5)	302 (100)
1999	20 (13.9)	22 (15.3)	40 (27.8)	13 (9.0)	16 (11.1)	33 (22.9)	144 (100)
Total	78 (15.8)	83 (16.8)	116 (23.5)	48 (9.7)	77 (15.6)	92 (18.6)	494 (100)

Table 3. Comparison of Agar Dilution MICs of Vancomycin and Methicillin Against Strains with Different Growth Type on Mu-3 Agar

Growth type on Mu-3 agar and control strain (No. tested)	MIC (µg/ml) of vancomycin*			MIC (µg/ml) of methicillin		
	Range	50%	90%	Range	50%	90%
Mu3-like (46)	3-10	5	8	128->2048	1024	2048
Mu50-like (63)	2-11	4	5	64->2048	1024	2048
Other types (48)	2-11	5	7	16->2048	512	1024
Total (157)	2-11	4	8	16->2048	1024	2048
ATCC 29213 (3) [†]	2-3	2.6 [†]	NA [†]	<4	<4 [†]	NA
H1 (8) [†]	3-7	4 [†]	NA	512	512 [†]	NA
Mu3 (8) [†]	6-10	5.6 [†]	NA	2048	2048 [†]	NA
Mu50 (8) [†]	4-10	7.6 [†]	NA	512-1024	832 [†]	NA

*Tested using BHIA with inocula of approximately 10⁶ for vancomycin and 10⁴ for methicillin.

[†]Number of repeated tests and mean, [‡]Not applicable

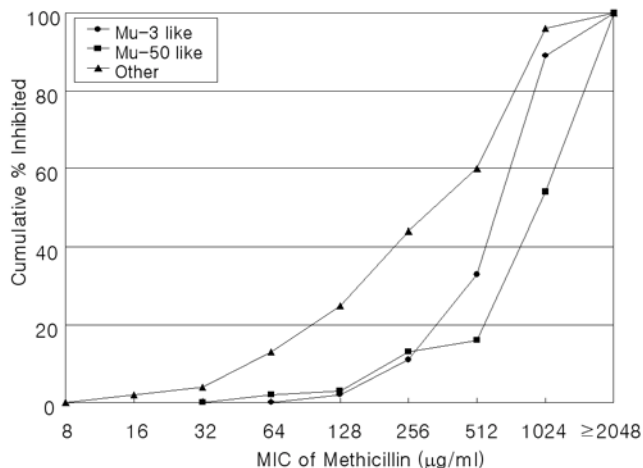


Fig. 1. Comparison of methicillin susceptibility of isolates with Mu3-like, Mu50-like and other type growth. MIC of methicillin was higher for isolates with Mu3-like and Mu50-like growth.

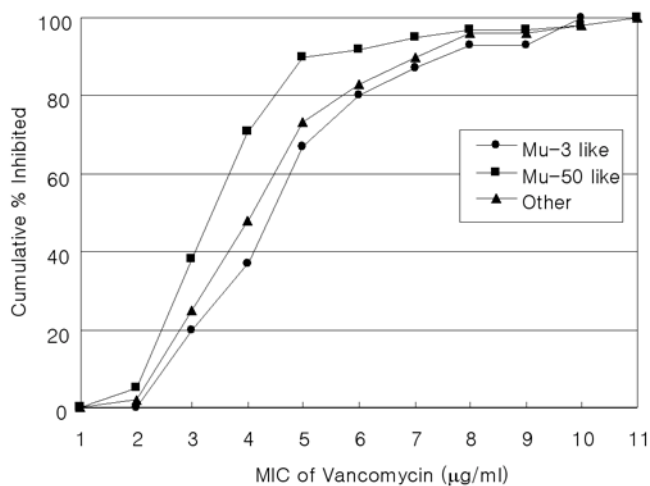


Fig. 2. Comparison of vancomycin susceptibility of isolates with Mu3-like, Mu50-like and other type growth. No significant difference by growth type was observed.

vancomycin에 대한 감수성을 본바 접종균수가 많으면 일부 세포가 더 높은 농도에서 증식하는 경향을 보였고, Mu-3 agar에서 Mu50형 증식을 보인 시기가 24시간인 균주와 48시간인 균주의 vancomycin에 대한 감수성은 비슷하였다 (Table 5).

Vancomycin 노출로 vancomycin에 대한 내성이 높아지는 지 보기 위한 실험에서 노출 전과 노출 후 균주의 접종 균수가 비슷했던 경우(균주 No. 1-4) 및 노출전 균주의 접종 균수가 많았던 경우(균주 No. 5와 6) 모두에서 노출된 균주에 대한 MIC가 높았고, 노출 후 균주의 접종 균수가 더 많았던 경우(균주 No. 7-9)에는 특히 MIC의 차이가 컸다

Table 4. Comparison of Broth Microdilution MICs of Vancomycin by Type of Growth and Incubation Time

Growth type on Mu3 agar (No. tested)	Incubation time (h)	No. of isolates with MIC ($\mu\text{g/ml}$) [*] :				
		1	2	3	4	5
Mu-3-like (18)	24	11	7	0	0	0
	48	3	10	5	0	0
	96	3	9	6	0	0
Mu50-like (50)	24	34	15	1	0	0
	48	15	29	6	0	0
	96	14	27	8	0	1

*Inocula were 10^4 CFU/well.

Table 5. Highest Concentration of Vancomycin-containing BHIA on Which Growth was Observed

Growth type on Mu-3 agar	Inoculum (CFU)	No. tested	No. of isolates with growth up to vancomycin ($\mu\text{g/ml}$):						
			2	3	4	5	6	7	11
Mu50-like (after 24-h incubation)	10^5	1	1						
	10^6	4		1	1		1	1	
	10^7	11		7	2	1	1		
	10^8	6	1	2	1	1	1		
	10^9	8	1	3		3			1
	Subtotal	30	3	13	4	5	3	1	1
Mu50-like (after 48-h incubation)	10^5	2	2						
	10^7	3		1	1	1			
	10^8	2				1		1	
	10^9	1			1				
	Subtotal	8	2	1	2	2		1	
Total		38	5	14	6	7	3	2	1

(Figure 3).

Vancomycin 8 $\mu\text{g/ml}$ 에 연속 노출되면 vancomycin에 대한 내성이 높아지는지를 농에서 분리된 vancomycin에 대한 내성이 높았던 균주(80-10-2589)를 써서 시험한 바(Figure 4) vancomycin 노출전의 균주는 전체 세포의 약 10^{-9} 만이 8 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 배지에서 증식하였으나, 8-12 $\mu\text{g/ml}$ 배지에서 증식한 세포수가 1차 노출 후에는 10^{-4} 로, 3-5차 노출 후에는 10^{-1} - 10^{-2} 로 많아졌다.

고 찰

1996년에 Hiramatsu 등²⁾은 vancomycin으로 치유 안된 수 술창에서 MRSA를 분리하였는데 이에 대한 vancomycin의 MIC는 8 $\mu\text{g/ml}$ 이었고 이 균주를 vancomycin-resistant S.

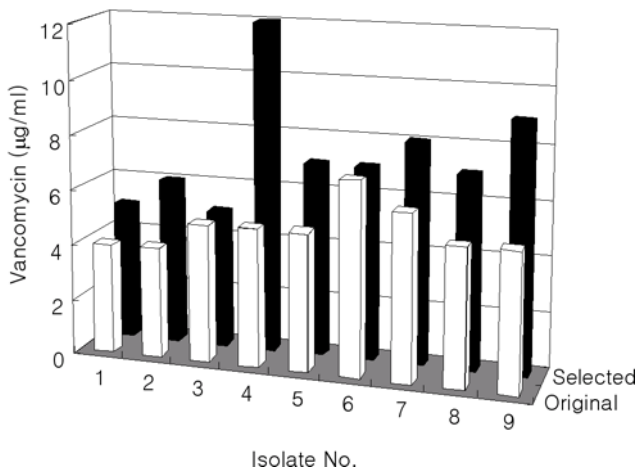


Fig. 3. Comparison of growth of original and selected isolates on media containing highest concentration of vancomycin. Isolates with Mu3-like growth on Mu-3 agar were tested. The inocula were 7/7 (in logs; original/selected isolates) for Nos. 1 and 2, 8/8 for No. 3, 9/9 for No. 4, 9/7 for Nos. 5 and 6, 6/7 for No. 7, 7/8 for No. 8, and 7/9 for No. 9.

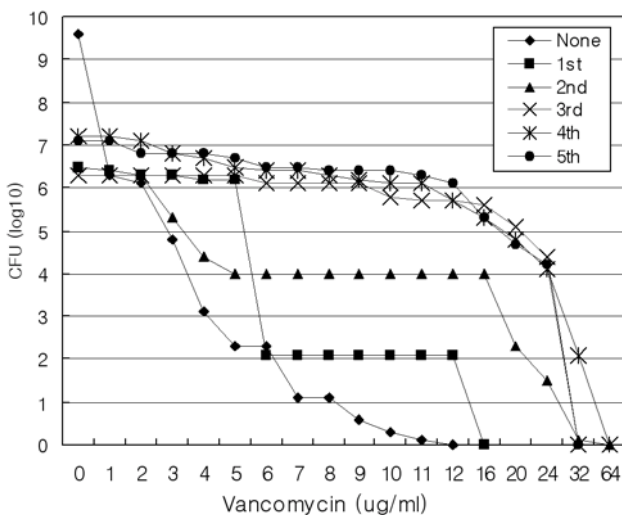


Fig. 4. Population analysis of an isolate before and after exposure to 8 µg/ml of vancomycin. After exposure to determine the potential to become VISA.

aureus (VRSA)라고 불렀다. 그러나 이 균주가 NCCLS 기준¹¹⁾으로는 vancomycin에 intermediate이므로 VISA 또는 GISA로 부르는 것이 옳다. Hiramatsu 등²⁾은 Mu3라는 균주도 보고하였는데, 이 균주에 대한 vancomycin의 MIC는 3 µg/ml이므로 VSSA이지만 다른 VSSA 균주보다는 vancomycin의 MIC가 더 높고 10⁷ 중의 소수 세포는 vancomycin 9 µg/ml 들은 배지에서도 증식하므로 h-VRSA라고 불렀다. H-VRSA는 4 µg/ml의 vancomycin이 들은 BHIA에서 48시간

이내에 1-30개의 집락을 형성하고 vancomycin으로 선택할 때 일부 세포가 8 µg/ml에 의해서야 증식 억제되며, 9일간 계대배양해도 내성세포가 지속된다고 하였다. 본 연구에서 VISA는 NCCLS법으로 MIC가 ≥5 µg/ml인 것으로, potential h-VRSA는 Mu-3 agar에서 aztreonam 디스크 주변에 위성현상을 보이는 것으로, h-VRSA는 vancomycin의 MIC가 ≤4 µg/ml이고 일부 세포는 5-8 µg/ml인 배지에서 증식되는 VSSA로 정의하였다.

Vancomycin에 감수성이 저하된 균주는 여러 가지 혼동되는 이름으로 불리고 있다. Pfeltz 등¹²⁾은 시험관내에서 선택된 vancomycin의 MIC 4-16 µg/ml인 균주를 GISA라고 불렀고, 이 들 중 1균주는 대부분의 세포가 vancomycin 농도 15 µg/ml인 배지에서도 증식하였고 더 높은 농도에서는 증식하지 않았으므로 그 내성을 homogeneous형이라고 하였다. Boyle-Vavra 등¹³⁾은 MI, NJ, PC 및 Mu50 균주 모두가 GISA이며, heteroresistance라고 인용한 반면에, Pfeltz 등¹²⁾은 MI 균주를 homogeneous형으로 인용하였다. Hong Kong에서 분리된 h-VRSA 3주는 VISA로 잘못 인용되기도 하였다⁷⁾.

VISA가 다른 모든 항균제에도 내성인 것은 아니다. VISA 감염이 일본에서는 ampicillin/sulbactam과 arbekacin 투여로, 프랑스에서는 quinupristin/dalfopristin 투여로 치유되었고, 미국에서 분리된 1주는 rifampin, chloramphenicol, cotrimoxazole에 감수성이었고¹⁴⁾, 미국의 한 균혈증 환자는 vancomycin, aminoglycoside 및 rifampin 투여로 치유되었다¹⁵⁾. β-lactam제와 vancomycin의 병합효과에 대해서는 Mu-3 agar에서 보이는 길항작용¹⁰⁾, 상승작용¹⁶⁾, MIC 이하의 농도에서의 길항작용과 MIC 이상 농도에서의 상승작용¹⁷⁾이 보고되었다. Kim 등¹⁸⁾은 h-VRSA인 Mu3 균주와 우리나라 분리 VISA 균주에 대한 시험에서, vancomycin과 0.5 µg/ml의 oxacillin은 길항작용을, 4 µg/ml는 상승작용을 나타냄을 보고하였다. Hanaki와 Hiramatsu¹⁹⁾는 imipenem 등 β-lactam제는 teicoplanin과 12주의 h-VRSA 및 Mu50 균주 모두에 대해 상승작용을 나타냈다고 하였다.

VISA의 내성 기전은 세균 세포벽이 vancomycin을 소모(consumption)하기 때문이며²⁰⁾, 따라서 VRE의 내성기전과는 다르므로, 그 중요성에 대해서는 아직 의문이라는 견해가 있으나¹⁴⁾, 염려되는 사실임에는 틀림없겠고^{7, 21)} 따라서 검사가 실제 당면한 문제는 VISA의 정확한 검출이라고 하겠다.

VISA는 디스크 확산법뿐 아니라 broth microdilution법으로도 정확한 검출이 어려우므로 6 µg/ml의 vancomycin이 들은 BHIA를 써서 선별하도록 권장되고 있다⁹⁾. 특히 h-

VRSA에 대한 vancomycin의 MIC는 2 $\mu\text{g/ml}$ 로 낮고²²⁾ 극히 일부 세포만이 ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ 에 내성이므로 그 검출이 어렵다. Hanaki 등은 h-VRSA 선별용 Mu-3 agar에 β -lactam 디스크를 놓으면 그 주변에 Mu3 균주가 증식하므로 VISA로 변할 가능성이 있는 h-VRSA를 선별할 수 있다고 하였다¹⁰⁾. 이 배지에서 Mu50 균주는 β -lactam 디스크 없이도 다수의 집락을 형성하므로 VISA의 선별도 가능할 것으로 추정된다.

VISA 검출 가능성을 높이고자 본 연구에서는 권장되는 탁도 보다 높은 McFarland 1관에 시험세균을 맞추고 면봉으로 접종하였다. 그러나 자가제조 BHIA에는 3.9%의 균주만이 증식하였고, 생긴 집락수도 적었다. 같은 검체가 접종된 Mu-3 agar에는 77.8%의 균주가 증식되었고 17.1%는 Mu50형 증식을 보였다(Table 1). MRSA가 분리된 연도에 따라서 Mu3 또는 Mu50형 증식을 보이는 비율을 비교한 바 1980년대에도 이러한 균주가 있었으나 그 비율은 낮았다(Table 2).

Sieradzki와 Tomasz¹⁾은 vancomycin 내성 변이주에 대한 methicillin의 MIC는 현저히 낮아졌다고 하였고, 본 연구에서도 Mu50균주에 대한 methicillin의 MIC가 Mu3 균주에 대해서 보다 약간 낮았으나, 임상분리주는 Mu50형과 Mu3형 이외의 것이 약간 낮은 경향을 보였다(Table 3). Pfeltz 등¹²⁾은 vancomycin 감수성이 저하된 균주에 대한 methicillin의 MIC가 더 낮지는 않았다고 하였다.

선별배지에 증식된 균주에서 VISA의 검출 가능성을 높이고자 NCCLS 한천희석법의 접종 균수인 약 10^4 보다 많은 10^6 로 시험한 바 MIC가 11 $\mu\text{g/ml}$ 인 균주들이 있었으나 대조 균주에 대한 시험의 재현성이 Tenover 등⁹⁾의 결과보다 낮았고(Table 3), NCCLS broth microdilution법¹¹⁾으로 다시 시험한 바 48시간 배양 후에도 MIC는 3 $\mu\text{g/ml}$ 이하이어서 이들 중에 VISA는 없다고 판단되었다(Table 4). 이 결과는 h-VRSA를 선별하기 위해서는 Mu-3 agar가 편리하고, VISA의 선별을 위해서는 vancomycin 6 $\mu\text{g/ml}$ 가 첨가된 BHIA가 편리함을 보인 것이라고 하겠다. 한편, Fraimow 등²³⁾은 vancomycin의 MIC를 BHIA로 시험하면 Mueller-Hinton agar로 시험할 때 보다 높아지므로 임상검사에 쓰기 적당한 감도와 특이도가 더 높은 VISA 선별 방법이 필요하다고 하였다.

다수의 세포 중에 높은 농도의 vancomycin에 증식이 억제되는 세포가 있는지 보기 위한 실험에서(Table 5), 접종 세균수가 비슷하게 되도록 탁도를 조정하여 시험하였으나 실제 집락수는 10^5 – 10^9 CFU이었는데, 일부 균주의 세포는 최고 11 $\mu\text{g/ml}$ 의 vancomycin이 들은 배지에서도 증식하였다. 이 결과로 볼 때 Mu3형 뿐 아니라 Mu50형 증식을 보

인 균주 중에도 h-VRSA가 있을 것으로 생각되었다. Mu3형 증식을 보인 possible h-VRSA는 15.6%, Mu50형 증식을 보인 possible h-VRSA는 18.6% 이었으나(Table 2) 이들 균주 모두의 population analysis를 하지는 않았으므로 진정한 h-VRSA의 비율은 알 수 없다. 김 등²⁴⁾은 1998–1999년에 입원환자 혈액에서 분리된 *S. aureus* 중의 16%가 possible h-VRSA로 판정되었다고 하였다. 일본에서는 5.8%의 균주가 Mu-3형 증식을 보였음이 보고된 바 있고¹⁰⁾, Hiramatsu²²⁾는 대학병원 분리 MRSA 중의 9.3%, 다른 병원 분리 주의 1.3%가 Mu-3형 population analysis 양상을 보였다고 하였다. Hong Kong의 MRSA 52주 중 5주가 aztreonam 디스크 주변에 위성현상을 보여 h-VRSA가 의심되었고, 이 중 3주가 h-VRSA이었음을 보고되었다²⁵⁾. 터키의 MRSA 105주를 vancomycin이 4 $\mu\text{g/ml}$ 들은 BHIA에 접종하여 24시간 후에 confluent growth를 보이면 potential VRSA로, 48시간 후에 셀 수 있는 집락이 생기면 possible VRSA로 간주하여 시험을 진행하였는데 VISA는 없었고, 5주는 MIC가 8 $\mu\text{g/ml}$ 인 세포를 포함한 h-VRSA이었음을 보고하였고²⁶⁾, Netherlands에서 1954–1997년에 분리한 MRSA 중에 h-VRSA는 없었으며²⁷⁾, 유럽 12개 국가에서 분리된 MRSA 중에 VISA나 h-VRSA는 없었다고 하였다²⁸⁾. 이러한 결과는 VISA가 아직은 드물며, h-VRSA가 세계 모든 지역에 퍼져있지는 않음을 뜻한다고 하겠다.

H-VRSA는 VISA로 변할 수 있기 때문에 관심의 대상이 된다. Pfeltz 등¹²⁾은 GISA형으로 변이되기 쉬운 균주가 있다고 하였다. 본 연구의 목적 중 한가지는 VISA로 변할 수 있는 MRSA가 우리나라 MRSA 중에 있는지 보기 위한 것이었다. 본 연구에서 Mu50형으로 증식된 9주의 population analysis를 하고, 가장 높은 농도의 vancomycin이 들은 배지에 생긴 집락으로 다시 population analysis를 할 때, vancomycin에 대한 내성이 높아짐을 보였다(Figure 3).

본 연구에서 또 한가지 목적은 체액 중에 도달되는 농도 정도의 vancomycin에 시험관내에서 노출될 때 VISA로 변할 수 있는 균주가 있는지 보기 위한 것이었다. Mu50형 증식을 보인 1980년에 농에서 분리된 균주를 8 $\mu\text{g/ml}$ 의 vancomycin이 들은 BHIA에 반복해서 노출시킨 바 MIC가 16 $\mu\text{g/ml}$ 까지 상승되었으며 32 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 증식되는 세포가 있었다(Figure 4). 즉, 원래 균주는 10^9 의 세포 중의 약 10^8 이 vancomycin 8 $\mu\text{g/ml}$ 에 감수성이었으나, 12 $\mu\text{g/ml}$ 에 감수성인 수가 8 $\mu\text{g/ml}$ 의 vancomycin이 들은 배지에 1차 노출 후에는 약 10^7 중 10^4 로, 2차 노출 후에는 약 10^7 중 10^3 로 감소되었다. 이 결과는 체액 중에 도달할 수 있는 van-

comycin 농도에 노출되면 VISA로 변할 수 있는 균주가 1980년에 분리된 MRSA 중에도 있었음을 뜻하는 것이고, 우리나라 환자에게 vancomycin이 장기간 투여되면 김 등⁶⁾이 보고한 바와 같은 VISA가 또다시 출현할 수 있을 것임을 뜻하는 것이라고 하겠다.

앞으로 규명되어야 할 것은 h-VRSA가 vancomycin이 없는 환경에 얼마동안 노출되면 vancomycin 내성 세포가 소실되는 지이다. Hiramatsu 등²⁾은 vancomycin이 없는 배지에 9대 계대 배양할 때 vancomycin에 내성인 subpopulation이 지속된 것을 h-VRSA로 정의하였다. Boyle-Vavra 등¹³⁾은 항균제가 포함되지 않은 배지에 15대 계대 배양하면 MI, NJ, PC, 및 Mu50 균주 모두가 Mu3와 비슷한 내성양상을 보이는 VSSA, 즉 h-VRSA로 변화하였음을 보고하였다. Vancomycin에 heteroresistance인 *S. aureus*에 대한 통상적인 검사는 현 시점에서 필요없다고 Fridkin²⁹⁾은 주장하였다.

이 연구에서 우리나라 한 종합병원에서 분리된 MRSA 중에서 VISA는 검출되지 않았으나 potential h-VRSA는 34.2%가 된다고 추정되었고, 따라서 vancomycin이 장기간 투여된 환자에서는 VISA가 출현할 가능성이 있다고 판단되었다. VISA를 선별하기 위해서는 Mu-3 agar를 사용하기보다는 BHIA 선별배지를 사용하는 것이 간편하고, h-VRSA를 선별하기 위해서는 Mu-3 agar를 사용하는 것이 필요하며, Mu50형 증식을 보이는 세균의 대부분은 VISA가 아니며, 이들 중에도 h-VRSA가 있을 것이라는 결론을 얻었다.

요 약

목 적 : Mu-3 agar를 사용하여 VISA로 변할 수 있는 h-VRSA가 우리나라 MRSA 중에 얼마나 있는지와 potential h-VRSA를 vancomycin이 든 배지에 계대 배양하면 vancomycin의 MIC가 어느 정도 높아지는지를 시험하고자 하였다.

방 법 : 1980-1999년에 분리 MRSA 494균주를 대상으로 BHIA 선별배지와 Mu-3 agar를 써서 VISA와 h-VRSA 선별하였다. Vancomycin의 MIC는 BHIA 혹은 BHI를 써서 NCCLS agar dilution 혹은 broth microdilution법으로 시험하였다. H-VRSA로 추정되는 균주를 vancomycin이 든 배지에서 배양하여 vancomycin의 MIC가 높아지는지를 population analysis로 시험하였다. Mu50형인 한 균주를 체액에 도달되는 정도의 vancomycin 농도에 연속하여 노출시키고 population analysis를 하여 vancomycin에 대한 내성의 변화를 관찰하였다.

결 과 : 455 균주의 MRSA 중 BHIA 선별배지에는 18주(3.9%) 만이 증식하였고 Mu-3 agar에는 354주(77.8%)가 증식하였다. Mu-3 agar에 증식된 66주(14.5%)는 h-VRSA로 추정되는 Mu3형 증식을, 78주(17.1%)는 VISA를 의심할 수 있는 Mu50형 증식을 보였다. 접종 균수를 약 10^6 CFU로 할 때 일부 균주에 대한 vancomycin의 MIC는 11 $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 NCCLS broth microdilution법으로 시험한 바 VISA는 없었다. Mu50형 증식 균주 중 일부 세포는 높은 vancomycin 농도에서 증식하였고, vancomycin 노출로 MIC가 높아졌다. Vancomycin 8 $\mu\text{g/ml}$ 에 연속 노출시키면 vancomycin 8-12 $\mu\text{g/ml}$ 배지에서 증식한 세포수가 1차 노출 후에는 10^{-4} 로, 3-5차 노출 후에는 10^{-1} - 10^{-2} 로 많아졌다.

결 론 : 시험된 MRSA 중에서 VISA는 검출되지 않았으나 h-VRSA는 있었으며, potential h-VRSA는 34.2%로 추정되었으므로 vancomycin이 장기간 투여된 환자에서는 VISA가 출현할 가능성이 있다고 판단되었다. VISA를 선별하기 위해서는 Mu-3 agar 보다는 BHIA 선별배지를 사용하는 것이 간편하고, h-VRSA를 선별하기 위해서는 Mu-3 agar를 사용하는 것이 필요하며, Mu50형 증식을 보이는 세균의 대부분은 VISA가 아니며, 이들 중에도 h-VRSA가 있다는 결론을 얻었다.

감사의 글

이 연구에 필요한 Mu50, Mu3 및 Hi 균주를 분양해준 일본 Juntendo 대학 K. Hiramatsu 교수에 감사하며, MRSA를 감별하고 보존한 본과 김명숙 주임임상병리사, 시험을 수행한 서영희, 김승희, 및 박안숙 연구원에게 감사 드린다.

참 고 문 헌

- 1) Sieradzki K, Tomasz A: Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 179:2557-2566, 1997
- 2) Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al.: Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350:1670-1673, 1997
- 3) Ariza J, Pujol M, Cabo J, Pena C, Fernandez N, Linares J, et al.: Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet* 353:1587-1588, 1999

- 4) Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A : *The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. N Engl J Med 340:517-523, 1999
- 5) Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, et al. : *Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 340:493-501, 1999
- 6) Kim M-N, Hiramatsu K, Pai CH : *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in Korea*. Korean J Clin Microbiol 2:S55, 1999
- 7) Moellering, RC Jr : *Staphylococci vs. glycopeptides-how much are the battle lines changing?* Clin Infect Dis 29: 768-770, 1999
- 8) Wenzel RP, Edmond MB : *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus: infection control considerations*. Clin Infect Dis 27:245-251, 1998
- 9) Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, et al. : *Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides*. J Clin Microbiol 36:1020-1027, 1998
- 10) Hanaki H, Ohkawa S, Inaba Y, Hashimoto T, Hiramatsu K : *Development of a medium (Mu3) for detection of hetero-vancomycin-resistant MRSA (hetero-VRSA)*. Abstr. C-132. 38th ICAAC, San Diego, 1998
- 11) NCCLS : *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standards. 5th ed.*, Wayne, PA, 2000
- 12) Pfeltz RF, Singh VK, Schmidt JL, Batten MA, Baranyk CS, Nadakavukaren MJ, et al. : *Characterization of passage-selected vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strains of diverse parental backgrounds*. Antimicrob Agents Chemother 44:294-303, 2000
- 13) Boyle-Vavra S, Berke SK, Lee JC, Daum RS : *Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in Staphylococcus aureus clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother 44:272-277, 2000
- 14) Johnson AP : *Intermediate vancomycin resistance in Staphylococcus aureus : a major threat or a minor inconvenience?* J Antimicrob Chemother 42:289-291, 1998
- 15) Turco TF, Melko GP, Williams JR : *Vancomycin intermediate-resistant Staphylococcus aureus*. Ann Pharmacother 32:758-760, 1998
- 16) Climo MW Patron RL, Archer GL : *Combination of vancomycin and β lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibility to vancomycin*. Antimicrob Agents Chemother 43:1747-1753, 1999
- 17) Howe RA, Wootton M, Bennett PM, MacGowan AP, Walsh TR : *Interactions between methicillin and vancomycin in methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains displaying different phenotypes of vancomycin susceptibility*. J Clin Microbiol 37:3068-3071, 1999
- 18) Kim S, Kim Y-S, Jung S-I, Oh WS, Cho HL, Peck KR, 등 : *Synergistic interaction of vancomycin (VAN) plus oxacillin (OXA) against hetero-vancomycin-resistant Staphylococcus aureus (hVRSA)*. 대한화학요법학회지 18:264, 2000
- 19) Hanaki H, Hiramatsu K : *Combination effect of teicoplanin and various antibiotics against hetero-VRSA and VRSA*. J Jap Soc Infect Dis 73:1048-1053, 1999
- 20) Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo N, Murakani H, Hiramatsu K : *Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strain Mu50*. J Antimicrob Chemother 42:315-320, 1998
- 21) Perl TM : *The threat of vancomycin resistance*. Am J Med 106:26S-37S, 1999
- 22) Hiramatsu K : *The emergence of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in Japan*. Am J Med 104:7S-10S, 1998
- 23) Fraimow H, Knob C : *What are optimal methods for detection of Staphylococcus aureus strains with reduced susceptibility to vancomycin?* Abstr C-147. 38th ICAAC, San Diego, 1998
- 24) 김의식, 김도마, 김홍빈, 방지환, 오명돈, 김의중 등 : *Heterogeneous resistance to vancomycin of clinical isolates of Staphylococcus aureus*. 대한화학요법학회지 17: s85, 1999
- 25) Wong SS, Ho PL, Woo PC, Yuen KY : *Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance*. Clin Infect Dis 29:760-767, 1999
- 26) Gulay Z, Atay T, Kuculguven M, Yulug N : *Staphylococcus aureus strains heterogeneously resistant to vancomycin at a university hospital in Turkey*. Abstr C-136. 38th ICAAC, San Diego, 1998
- 27) van den Braak N, van Belkum A, te Witt R, Verbrugh A, Endtz HP : *Glycopeptide resistance amongst Staphylococcus spp.* J Antimicrob Chemother 42:673-675, 1998
- 28) Schmitz F-J, Krey A, Geisel R, Verhoef J, Heinz H-P, Fluit AC, SENTRY participant group : *Susceptibility of 302 methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from 20 European university hospitals to vancomycin and alternative antistaphylococcal compounds*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18:528-530, 1999
- 29) Fridkin SK : *Update on VISA*. Abstr. K-1902. 40th ICCAC, Toronto, 2000